

Cholesterol efflux as a measure of HDL functionality in humans

Citation for published version (APA):

Talbot, C. P. J. (2018). *Cholesterol efflux as a measure of HDL functionality in humans: impact of genetics, diet and weight loss*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20180419ct>

Document status and date:

Published: 01/01/2018

DOI:

[10.26481/dis.20180419ct](https://doi.org/10.26481/dis.20180419ct)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary



Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide, representing 31% of all global deaths. CVD are defined by several diseases of the heart and blood vessels, and involve several disorders, including coronary heart disease (CHD), peripheral arterial disease and cerebrovascular disease. One of the underlying causes of CHD is atherosclerosis. Dyslipidemia, characterized by a high level of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triacylglycerol (TAG), and a low level of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), is an important risk factor for the development of atherosclerosis. Although an inverse relationship between serum HDL-C concentrations and CVD risk has been found in several epidemiological studies, raising HDL-C levels failed to reduce CVD risk. It becomes, however, more and more accepted that improving HDL functionality represents a better target to reduce CVD risk. Indeed, a strong inverse relationship between HDL-mediated cholesterol efflux capacity, and the prevalence and the incidence of coronary artery disease (CAD) has been demonstrated in several epidemiological studies, and HDL-mediated cholesterol efflux was a strong predictor of CAD.

The research presented in this thesis focused on (1) a systematic review discussing factors and ABC-transporters that are associated with HDL-mediated cholesterol efflux in humans, and on (2) modulators of ABCA1-mediated cholesterol efflux from macrophages in humans. For this, the associations between genetic determinants, molecular factors, such as microRNAs (miRNAs), and environmental factors, i.e. diet and weight loss, and cholesterol efflux capacity were investigated.

In **chapter 2**, associations between ABC-transporters, HDL particle characteristics, subjects' characteristics, HDL-C raising drugs, lifestyle, genetic background, as well as acute and low-grade systemic inflammation and HDL-mediated cholesterol efflux were reviewed. These studies showed that in particular small pre β -1 HDL is an important determinant of HDL-mediated cholesterol efflux. This seems to contradict results from epidemiological studies, suggesting that large HDL₂ particles are related to a reduced CVD risk. **Chapter 3** discusses the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and HDL-mediated cholesterol efflux in healthy volunteers. In this study, SNPs coding for key genes involved in the reverse cholesterol transport pathway from 50 men and 57 women were determined, and HDL-mediated cholesterol efflux was measured by incubating radiolabeled-³H-cholesterol loaded murine J774 macrophages overexpressing ABCA1 with apolipoprotein B-depleted serum. HDL-mediated cholesterol efflux was related to SNPs located in *ABCA1*, *ABCG1*, *LXR β* and *CETP*. However, there is no evidence in the literature so far that these SNPs are related with a change in the risk to develop CVD. Further, ABCA1-mediated cholesterol efflux was positively associated with the use of statins and HDL-C concentrations, and a negative trend was observed for

age, while no associations were found for gender and BMI. In **chapter 4**, the effect of theobromine consumption on fasting and postprandial cholesterol efflux was studied. In addition, three miRNAs known to be associated with HDL particles were selected, and their association with HDL-efflux capacity was investigated. In this randomized double-blind cross over study 30 overweight and 14 obese healthy men and women were included. Subjects were asked to consume 500 mg of theobromine or placebo daily for 4 weeks. At the end of the intervention, fasting and postprandial samples were collected. Cholesterol efflux was measured in BODIPY-labeled murine J774 macrophages overexpressing the ABCA1 transporter, and miRNAs levels (miR-92a; miR-223 and miR-135a*) were quantified. This study showed that high-fat meal intake increased postprandial cholesterol efflux capacity, as well as miR-92a and miR-223 levels. However, 4 weeks of theobromine consumption did not increase HDL-mediated cholesterol efflux capacity at baseline and postprandially. In addition, theobromine could exert anti-atherogenic properties by reducing miR-92a levels. **Chapter 5** describes the effect of plant sterol and plant stanol consumption on cholesterol efflux and on CETP (cholesteryl ester transfer protein) mass and activity in 107 healthy men and women. This chapter used results from two studies previously performed at Maastricht University. In the first study subjects had to consume a control margarine or a margarine enriched with plant stanol esters for 8 weeks. In the second study, subjects were asked to consume a control margarine, or a plant sterol ester enriched margarine, or a plant stanol ester enriched margarine for 85 weeks. Cholesterol efflux was measured by incubating radiolabeled-³H-cholesterol loaded murine J774 macrophages overexpressing ABCA1 with apolipoprotein B-depleted serum. Plant stanol intake significantly decreased CETP mass, but had no effect on CETP activity and cholesterol efflux. No effects of plant sterols were found on any of these parameters. Finally, **chapter 6** describes the effect of diet-induced weight loss on HDL-mediated cholesterol efflux and CETP activity in abdominally obese men. Cross-sectional differences at baseline between normal-weight and abdominally obese men were also investigated. Twenty-five apparently healthy, normal-weight men and 52 abdominally obese men were included in this study. Abdominally obese subjects were randomly allocated to a dietary weight-loss intervention group or a no-weight loss control group. Individuals from the intervention group followed a very-low-calorie diet for 6 weeks to obtain a waist circumference below 102 cm, followed by a weight-stable period of 2 weeks. Cholesterol efflux was measured in BODIPY-labeled murine J774 macrophages. CETP activity was measured by quantifying the transfer of CE from radiolabeled exogenous HDL to apoB-containing lipoproteins. Cross-sectionally, cholesterol efflux was negatively associated with the body mass index, while a positive association was found for CETP activity. However, diet-induced weight loss of 10 kg did not improve these two parameters. It would be of interest to address in future

studies the importance of a longer period of stable body weight and the involvement of other transporters on efflux pathways.

Taken together, the research studies described in this dissertation were designed to assess how HDL functionality, i.e. HDL cholesterol efflux capacity, can be modulated and improved in humans. It was demonstrated that SNPs of genes involved in HDL metabolism are related to the ability of HDL to promote cholesterol efflux. Unfortunately, the dietary factors investigated as well as weight loss were not associated with an improvement in HDL-mediated cholesterol efflux. Further studies are therefore needed in order to determine the best dietary strategies to improve cholesterol efflux capacity, and to ultimately reduce CVD risk.



Résumé



Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de décès dans le monde, représentant 31% de la mortalité mondiale totale. Les MCV sont définies par plusieurs maladies du cœur et des vaisseaux sanguins et implique un ensemble de troubles comprenant les maladies coronariennes, les artériopathies périphériques et les maladies cérébro-vasculaires. Une des causes sous-jacentes des maladies coronariennes est l'athérosclérose. La dyslipidémie, caractérisée par un taux élevé du cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL-C) et des triglycérides (TG), et un faible taux du cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-C), est un facteur de risque important dans le développement de l'athérosclérose. Bien qu'une association inverse entre les concentrations sériques de HDL-C et le risque de MCV ait été constatée dans plusieurs études épidémiologiques, l'élévation des concentrations de HDL-C n'a pas réussi à réduire le risque de MCV. Il est de plus en plus accepté que stimuler la fonctionnalité des particules HDL constitue une meilleure cible pour réduire le risque de MCV. En effet, une forte relation inverse entre l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL et la prévalence et l'incidence des MCV a été démontrée, et l'efflux de cholestérol est un prédicteur des MCV.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont porté sur (1) une analyse systématique des facteurs et des transporteurs ABC associés à l'efflux de cholestérol médiés par les particules HDL chez l'humain et (2) des modulateurs de l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL chez l'humain, via le transporteur ABCA1. Pour ce faire, les associations entre les déterminants génétiques, les facteurs moléculaires, tels que les micro-ARN (miARN), et les facteurs environnementaux, tels que l'alimentation et la perte de poids, et l'efflux de cholestérol ont été étudiés.

Dans le **chapitre 2**, les associations entre les transporteurs ABC, les caractéristiques des particules HDL, les caractéristiques des sujets, les médicaments destinés à augmenter le taux de HDL-C, le mode de vie, les antécédents génétiques, ainsi que l'inflammation systémique de bas grade, et l'efflux de cholestérol médié par les particules HDL ont été étudiés. Ces études ont montré que les petites particules pre β -1 HDL sont d'importants déterminants dans l'efflux de cholestérol. Cela semble contredire les résultats d'études épidémiologiques qui suggèrent que les grandes particules de HDL2 sont liées à un risque réduit de MCV. Le **chapitre 3** traite de l'association entre les polymorphismes nucléotidiques (SNP) et l'efflux de cholestérol médié par les particules HDL chez des volontaires sains. Dans cette étude, des SNPs codant pour des gènes clés impliqués dans la voie de transport du cholestérol inverse chez 50 hommes et 57 femmes ont été déterminés, et l'efflux de cholestérol a été mesuré en incubant des macrophages murins J774 marqués radioactivement à l'aide de ³H-cholestérol surexprimant le transporteur ABCA1

avec du sérum dépourvu d'apolipoprotéines-B (apoB). Nous avons conclu que l'efflux de cholestérol médié par ABCA1 était positivement associé à l'utilisation des statines et aux concentrations de HDL-C, et une tendance négative a été observée pour l'âge. De plus, la capacité d'efflux de cholestérol était liée aux SNPs codant pour les gènes ABCA1, ABCG1, LXR β et CETP. Cependant, il n'y a jusqu'à présent aucune preuve dans la littérature que ces SNP sont liés à un changement dans le risque de développer des MCV. De plus, l'efflux de cholestérol médié par ABCA1 était positivement associé avec l'utilisation de statines et les concentrations de HDL-C, et une tendance négative a été observée pour l'âge, alors qu'aucune association n'a été trouvée pour le sexe et l'indice de masse corporelle (IMC). Dans le **chapitre 4**, nous avons étudié l'effet de la consommation de théobromine sur l'efflux de cholestérol à jeun et postprandial. De plus, trois miARNs connus pour être associés aux particules de HDL ont été sélectionnés, et leur association avec la capacité d'efflux de HDL a été étudiée. Dans cette étude randomisée en cross-over et double aveugle, 30 hommes et femmes en surpoids et 14 hommes et femmes obèses en bonne santé ont été inclus. Les sujets ont dû consommer 500 mg de théobromine ou de placebo par jour pendant 4 semaines. À la fin de l'intervention, des échantillons à jeun et des échantillons postprandiaux ont été prélevés. L'efflux de cholestérol a été mesuré dans des macrophages murins J774 marqués à l'aide de BODIPY-cholestérol surexprimant le transporteur ABCA1. Les concentrations de chaque miARNs (miR-92a, miR-223 et miR-135a*) ont été quantifiées. Cette étude a montré que la consommation d'un repas riches en graisses augmente la capacité d'efflux de cholestérol, ainsi que les concentrations de miR-92a et miR-223. Cependant, 4 semaines de consommation de théobromine n'ont pas amélioré la capacité d'efflux de cholestérol médiée par le HDL, à jeun et à la suite du repas. De plus, la théobromine pourrait exercer des propriétés anti-athérogènes en réduisant les concentrations de miR-92a. Le **chapitre 5** décrit l'effet de la consommation de stérols et de stanols végétaux sur l'efflux de cholestérol ainsi que sur l'activité et la masse de CETP (cholesteryl ester transfer protein), chez 107 hommes et femmes en bonne santé. Ce chapitre regroupe les résultats de deux études réalisées précédemment à l'Université de Maastricht. Dans la première étude, les sujets devaient consommer une margarine témoin ou une margarine enrichie en stanols végétaux pendant 8 semaines. Dans la deuxième étude, il a été demandé aux sujets de consommer une margarine témoin, une margarine enrichie en stérols végétaux ou une margarine enrichie en stanols végétaux pendant 85 semaines. L'efflux de cholestérol a été mesuré dans des macrophages murins J774 marqués à l'aide de 3H-cholestérol surexprimant le transporteur ABCA1. La consommation de stanols végétaux a significativement diminué la masse de CETP, mais n'a eu aucun effet sur l'activité de la CETP et l'efflux de cholestérol. De plus, aucun effet des stérols végétaux n'a été trouvé sur aucun des paramètres testés. Enfin, le **chapitre 6** décrit l'effet de la perte

de poids, induite par un régime alimentaire, sur l'efflux de cholestérol et l'activité de la protéine impliquée dans le transfert des esters de cholestérol entre les différentes lipoprotéines, i.e. CETP, chez des hommes présentant une obésité abdominale. De plus, les différences entre les hommes de poids normaux et les hommes obèses ont également été étudiées. Vingt-cinq hommes apparemment en bonne santé, de poids normal et 52 hommes obèses ont été inclus dans cette étude. Les sujets présentant une obésité abdominale ont été répartis de façon aléatoire dans le groupe d'intervention ou le groupe témoin sans perte de poids. Les individus du groupe d'intervention ont suivi un régime très faible en calories pendant 6 semaines pour obtenir un tour de taille inférieur à 102 cm, suivi d'une période de 2 semaines au cours de laquelle le poids devait rester stable. L'efflux de cholestérol a été mesuré dans des macrophages murins J774 marqués à l'aide de BODIPY-cholestérol, et surexprimant le transporteur ABCA1. L'activité de CETP a été mesurée en quantifiant le transfert de cholestérol estérifiés entre des particules exogène de HDL vers les lipoprotéines riches en apoB. Il a été démontré que l'efflux de cholestérol était négativement associé à l'IMC, tandis qu'une association positive a été observée pour l'activité de CETP. Toutefois, la perte de poids de 10 kg induite par le régime alimentaire n'a pas amélioré ces deux paramètres. Il serait intéressant d'aborder, dans des études futures, l'importance d'une plus longue période de stabilité du poids corporel et l'implication de d'autres transporteurs dans l'efflux de cholestérol.

Les études de recherche décrites dans cette thèse ont été conçues pour évaluer comment la fonctionnalité des particules de HDL peut être modulée et améliorée chez l'humain. Il a tout d'abord été démontré que des SNP codant pour des gènes impliqués dans le métabolisme des HDL sont liés à la capacité des particules de HDL à stimuler l'efflux de cholestérol. Malheureusement, les facteurs alimentaires étudiés ainsi que la perte de poids n'ont pas été associés à une amélioration de l'efflux de cholestérol médié par le HDL. D'autres études sont donc nécessaires afin de déterminer les meilleures cibles pour améliorer la capacité d'efflux de cholestérol et, à terme, réduire le risque de MCV.

